

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
in this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 3月19日

願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第069787号

願 人
Applicant(s):

株式会社日立製作所

RECEIVED

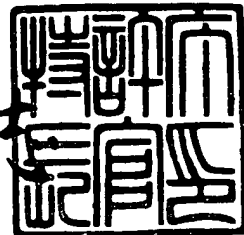
APR 13 1999

GROUP 1700

1999年 3月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



【書類名】 特許願

【整理番号】 1597009771

【提出日】 平成10年 3月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 B01D 15/00

【発明の名称】 核酸分離に用いるチップ、構造体およびその形成方法

【請求項の数】 13

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 502 番地
株式会社 日立製作所 機械研究所内

【氏名】 池田 由紀子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 502 番地
株式会社 日立製作所 機械研究所内

【氏名】 遠藤 喜重

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 502 番地
株式会社 日立製作所 機械研究所内

【氏名】 吉村 保廣

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市市毛 882 番地
株式会社 日立製作所 計測器事業部内

【氏名】 寺山 孝男

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市市毛 882 番地
株式会社 日立製作所 計測器事業部内

【氏名】 保田 健二

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市市毛 882 番地

株式会社 日立製作所 計測器事業部内

【氏名】 桜井 智也

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市市毛 882 番地

株式会社 日立製作所 計測器事業部内

【氏名】 横山 哲夫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県土浦市神立町 502 番地

株式会社 日立製作所 機械研究所内

【氏名】 青野 宇紀

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

【識別番号】 100068504

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 勝男

【電話番号】 03-3212-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013088

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9003094

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸分離に用いるチップ、構造体およびその形成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

液体試料より核酸を分離する構造体を備えたチップにおいて、
珪素酸化物類を含み、この珪素酸化物類よりも径の大きい孔を有する構造体を
その流路に内包したチップ。

【請求項 2】

前記構造体が多孔質体である請求項 1 記載のチップ。

【請求項 3】

液体試料より核酸を捕捉するために用いる構造体において、
珪素酸化物類を含み、この珪素酸化物類よりも径の大きい孔を有する構造体。

【請求項 4】

前記構造体が多孔質体である請求項 3 記載の構造体。

【請求項 5】

珪素酸化物類の粒子と、有機物と、珪素化合物を含有するゾルゲル溶液とを混
合し型に入れる工程と、
熱処理により前記ゾルゲル溶液を縮重合させて混合した材料を成型体にし前記
型から取り出す工程と、
この成型体を熱処理し有機物を燃焼させる工程とを有する構造体の形成方法。

【請求項 6】

前記珪素酸化物類の粒子が $0.001\mu\text{m}$ 以上 $20\mu\text{m}$ 以下である請求項 5 記載の構
造体の形成方法。

【請求項 7】

前記有機物が $50\mu\text{m}$ 以上 $1000\mu\text{m}$ 以下の樹脂粒子である請求項 5 または 6 に記
載の構造体の形成方法。

【請求項 8】

前記有機物が合成あるいは天然繊維あるいはそれらを紐状にしたものである請
求項 5 または 6 に記載の構造体の形成方法。

【請求項 9】

樹脂粒子と、この樹脂粒子より小さい径の珪素酸化物類の粒子と、有機溶媒とを混合する工程と、

これらを型に入れ樹脂粒子が互いに融着する温度で熱処理した後に型より取り出す工程とを有する構造体の形成方法。

【請求項 10】

前記珪素酸化物類の粒子径が前記樹脂粒子径の $1/10$ 以下である請求項 9 に記載の構造体の形成方法。

【請求項 11】

前記樹脂粒子が中空樹脂粒子である請求項 9 または 10 に記載の構造体の形成方法。

【請求項 12】

多孔質体からなる材料を珪素化合物を含有するゾルゲル溶液に浸漬する工程と

前記材料を前記ゾルゲル溶液から取り出した後、熱処理により前記ゾルゲル溶液を縮重合させる工程とを有する構造体の形成方法。

【請求項 13】

多孔質体からなる材料を粒子が分散した珪素化合物を含有するゾルゲル溶液に浸漬する工程と、

前記材料を前記ゾルゲル溶液から取り出した後、熱処理により前記ゾルゲル溶液を縮重合させる工程とを有する構造体の形成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は生体試料等の核酸を含有する試料より核酸成分あるいはプラスミド DNA を分離する核酸捕捉用チップとそれに内包される構造体およびその形成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来の生体試料等の核酸を含有する試料から核酸を分離する方法としては、まず生体試料等を蛋白質分解酵素の存在下で界面活性剤を作用させ、核酸を遊離させた後、フェノール（およびクロロホルム）と混合し、遠心分離器による水相・有機相分離を数回行った後、水相からアルコールにより沈殿物の形で核酸を回収する方法や、珪素酸化物等ある特定の一種類の粒子を容器に詰めた構造体を用いたカラムクロマトグラフィーが一般的に行われてきた。近年これらの方法をより簡便にするため種々の方法および装置の検討がされている。

【0003】

特開平9-47278号公報には、DNAを培養液から全自動で安価に抽出することができるDNA抽出精製方法及び装置が記載されている。この装置のチップは、トラップフィルターおよびメンブランフィルターを含む第一フィルターチューブと、ガラス繊維フィルター、ガラスパウダー層およびメンブランフィルターを含む第二フィルターチューブを上下重ねあわせた構造であり、真空装置（ポンプ）によって不純物の濾過、DNAの吸着、洗浄、溶出を順次行うことにより抽出する構成である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

遠心分離を用いて核酸を分離する場合、装置が大がかりとなり且つ高速回転させるために核酸自体が損傷してしまう。

【0005】

カラムクロマトグラフィーや上記文献のチップでは、ある特定の一種類の粒子を容器に詰めた場合、微粒子の性質上（特に粒径がそろっていれば）細密構造となり、粒度分布がある場合は大きい粒子の間に小さい粒子が凝集して入り密になるので、液通りが悪くなってしまい、試料が通過するのに非常に時間を要してしまう。そこで時間を短縮するために真空ポンプを用いて試料を分離すると、遠心分離同様に核酸が切断されてしまうという問題があった。

【0006】

本願発明の目的は上記課題を解決し、生体試料が通過し易い構造体として真空ポンプを不要とすることで、核酸を生体試料から切断等の欠陥なく分離できる構造体に適した材料と、その材料を製造する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するため、本発明のチップは、珪素酸化物類を含み、この珪素酸化物類よりも径の大きい孔を有する構造体をその流路に内包したものとする。

【0008】

核酸がシリカやガラスのような珪素酸化物に吸着することは既に知られている。一般にシリカ (SiO_2) といっても多くの変態があり、主要なものは石英、トリジマイト、クリストバル石の3つでさらに高温型と低温型がそれぞれ存在する。また石英は塩ではないが縮合形式から珪酸塩鉱物に分類されることもある。また普通のガラスは縮合珪酸の三次元不規則網状構造の中にアルカリ金属やアルカリ土類金属のイオンが入って安定化した無定形物質である。その外に珪素のアルコキシド化合物を用いて加水分解反応及び脱水縮合反応からシリカを形成する方法もある。本願明細書中においては、これらシリカ、ガラス、珪酸塩、珪酸塩鉱物、珪酸の縮合体で結晶性、非結晶性のものすべてをまとめて珪素酸化物類という。

【0009】

また、構造体とは、チップ内に挿入できる大きさで、DNAを吸着するために用いるための物のことである。

【0010】

核酸はチップに内包された構造体の内部を通過時に、その内部の流路面に存在する珪素酸化物類の部分に捕捉される。なお本願発明における構造体は液体が通過可能な流路を有するため、液通りがよく特別な真空装置を用いて吸引しなくても液体試料の吸引吐出を行うことが可能である。

【0011】

このような核酸捕捉用構造体は、珪素酸化物類の粒子と有機物と珪素酸化物類

の粒子を結合させるための珪素化合物を含有するゾルゲル溶液を型に入れる工程と、熱処理により珪素化合物を含有するゾルゲル溶液を縮重合させ型より取り出す工程と、型より取り出された成型体を熱処理し有機物を燃焼させることによって流路を形成する工程を行うことにより形成できる。ここで用いる有機物は樹脂の粒子あるいは繊維状のもの、または木や竹などの植物である。

【0012】

あるいは樹脂粒子とその樹脂粒子より小さい径の珪素酸化物類の粒子と有機溶媒を均一に混合する工程と、これらを型に入れ樹脂粒子が互いに融着する温度で熱処理し型より取り出す工程を行うことにより形成できる。

【0013】

また核酸を含有する液体が通過可能な流路を持つ構造体を、珪素化合物を含有するゾルゲル溶液に浸漬する工程と、溶液から取り出した後熱処理により珪素化合物を含有するゾルゲル溶液を縮重合させる工程を行うことにより形成できる。

【0014】

さらに核酸を含有する液体が通過可能な流路を持つ構造体を、粒子が分散した珪素化合物を含有するゾルゲル溶液に浸漬する工程と、溶液から取り出した後熱処理により珪素化合物を含有するゾルゲル溶液を縮重合させる工程を行うことにより形成できる。

【0015】

【発明の実施の形態】

本願発明の核酸捕捉用チップは、臨床検査や研究分野において核酸より遺伝情報を得るため、生体試料等の核酸を含有する液体試料より核酸を分離する前処理装置の核酸抽出に用いられる。この遺伝子検査前処理装置においては次に示すような手順にて核酸の抽出を行う。なお図1に装置平面構成図を、図2に核酸の分離を行う際の流路図を示す。

【0016】

この図2において、液体試料や洗浄液等後述する液を吸引吐出する際に液が入る部分がチップ15、19であり、ノズル8、9、ノズルホルダー6、7、配管4、5を介してシリンジ2、3に接続している。このチップ内に本発明の核酸を

捕捉するための構造体（図示せず）を内包したものがチップ 19 である。これら両チップ先端は内径にテーパーが付いており、液体試料内の核酸を捕捉するための構造体はチップ内に封入されている。また各種液体試料を分注するために用いるチップは何も内包していない。ここでは区別するため、以下分注チップ 15 とする。

【0017】

以下に装置の構成を説明する。

【0018】

シリンジ 2, 3 は、それぞれ独立に、且つ、自動的に液体試料の吸引と吐出の制御を行うことが出来る。シリンジ 2, 3 はそれぞれ配管 4, 5 を通して、ノズル 8, 9 に、それぞれ独立に接続されている。ノズル 8, 9 はノズルホルダー 6, 7 に固定されており、ノズルホルダー 6, 7 はそれぞれアーム 10, 11 に Y 軸方向、Z 軸方向への移動が可能な状態で固定されている。アーム 10, 11 は、それぞれ独立に X 軸方向への移動が可能であり、Z 軸方向に差を持たせる事により、X 軸方向に一部分をオーバーラップすることができ、ノズルホルダー 6, 7 とアーム 10, 11 の動作の組み合わせにより、装置平面状の主要な部分への移動を制御することができる。

【0019】

分注チップラック 14 には分注チップ 15 を収納することができ、同じ物を計 3 個設置することができる。反応容器ラック 16 には反応容器 17 が 48 本設置でき、精製品ラック 20 には精製品収納容器 21 が 48 本設置できる。また、洗浄液ボトル 22、溶離液ボトル 23、希釈液ボトル 24、結合促進剤ボトル 25 をそれぞれ 1 ボトル設置できる。チップラック 18 には、チップ 19 を 48 本設置することができる。

【0020】

アーム 11 とノズルホルダー 7 の制御により分注チップラック 14 上の目的とする分注チップ 15 の上方へノズル 9 を制御した後、下方へノズルホルダー 7 を移動し、分注チップ 15 の所定の位置とノズル 9 を接触させ、ノズル 9 の先端に分注チップ 15 を自動的に取り付けることができる。同様の制御をノズル 8、ノ

ズルホルダー 6、アーム 10で行うことにより、ノズル 8の先端にチップ 19を取り付けることができる。

【0021】

アーム 11とノズルホルダー 7の制御によりチップ抜き 27の手前上方へノズル 8を移動させた後、ノズルホルダー 7の制御によりノズル 9と分注チップ 15の接合部がチップ抜き 27よりも下部になるように移動させ、更に、ノズル 8をチップ抜き 27の方向へ移動させる。その後、ノズル 9の一部をチップ抜き 27に接触したままノズルホルダー 7を上方に移動させることにより、ノズル 9から分注チップ 15を自動的に取り外すことができる。同様の制御をノズル 8、ノズルホルダー 6、アーム 10で行うことにより、ノズル 8からチップ 19を取り外すことができる。

【0022】

液受け 29, 30は、ノズル 8, 9からの吐出液を受ける事が可能で、それぞれのホームポジションとして機能し、受けた液体は廃液として図示しない次の過程に送られる。洗浄部 26は流水の吐出によりノズルホルダー 7にノズル 9を介して取り付けられた分注チップ 15を洗浄することができる。

【0023】

以下に、この自動装置を用いた血清へ添加したDNAの回収に関し、より詳細に説明する。

【0024】

ヒトの血清に市販精製品のλ DNA (Fermentas社製)を添加し、ヌクレアーゼ対策のために終濃度で1%となるようにSDSを添加したものを検体液 13 (液体試料)として、検体ラック 12に収め、図1の装置上の検体ラック 12に収納した。分注チップ 15を収納した分注チップラック 14、チップ 19を収納したチップラック 18、各試薬ボトル 22, 23, 24, 25、反応容器 17、精製品容器 21を図1の装置上の所定の位置にセットした後、装置に次の操作を行わせる。

【0025】

まず、第1工程では、検体液 13と結合促進剤を混合する操作を行う。

【0026】

アーム11とノズルホルダー7の制御によりノズル9に分注チップ15を所定の動作により取り付けした後、アーム11とノズルホルダー7及びシリンジ3の制御により結合促進剤ボトル25より所定量の塩酸グアニジンを吸引し、更に、50 μ lの空気を吸引し、制御により洗浄部26へ移動し、分注チップ15の外壁を流水洗浄する。洗浄後、制御によりノズルホルダー7を検体ラック12上の所定の検体液13の位置へ移動し、シリンジ3の制御により所定量の検体液13の吸引を行う。吸引後、制御によりノズルホルダー7を反応容器ラック16上の所定の反応容器17に全量を吐出する。吐出後、更に吸引と吐出を行うことにより検体液13と結合促進剤である塩酸グアニジンを混合する。混合後、制御によりノズルホルダー7をチップ抜き27の位置へ移動し、所定の動作によりノズル9から分注チップ15を取り外す。

【0027】

第2工程では、チップ19内の核酸を捕捉するための構造体に核酸(ここではDNA)を結合させる。

【0028】

アーム10とノズルホルダー6の制御によりノズル8にチップ19を所定の動作により取り付けした後、ノズルホルダー6を反応容器ラック16上の前記混合液の入った反応容器17に移動し、シリンジ2の制御により、チップ19の内部へ混合液を吸引する。吸引後、シリンジ2の制御により、所定の回数吸引と吐出を繰り返し、構造体と混合液を接触させる。

【0029】

第3工程では、核酸を捕捉するための構造体に核酸を捕捉させた後の残渣液を排出する。

【0030】

所定の回数、吸引と吐出を繰り返した後、チップ19内に反応容器17内の混合液を吸引した後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により廃液口28へ移動し、チップ19内の混合液をシリンジ2の制御により吐出する。吐出後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により液受け29へ移動する。

【0031】

第4工程では、チップ19内の核酸が捕捉された構造体の洗浄を行う。

【0032】

アーム11とノズルホルダー7の制御によりノズル9に分注チップ15を所定の動作により取り付けした後、アーム11とノズルホルダー7及び、シリンジ3の制御により洗浄液ボトル22から所定量の洗浄液を吸引し、制御によりノズルホルダー7を反応容器ラック上16の所定の反応容器17に吐出する。吐出後、アーム11とノズルホルダー7の制御によりノズルホルダー7をチップ抜き27の位置へ移動し、所定の動作によりノズル9から分注チップ15を取り外す。

【0033】

ノズルホルダー7の移動後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により洗浄液の入った反応容器ラック16上の所定の反応容器17に移動し、シリンジ2の制御によりチップ19内へ洗浄液を吸引する。吸引後、シリンジ2の制御により、所定の回数吸引と吐出を繰り返し、核酸が捕捉された構造体を洗浄液により洗浄する。所定の回数、吸引と吐出を繰り返した後、チップ19内に反応容器17内の洗浄液を吸引した後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により廃液口28へ移動し、チップ19内の洗浄液をシリンジ2の制御により吐出する。吐出後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により液受け29へ移動する。

【0034】

必要に応じて第4工程は所定の回数繰り返す。

【0035】

第5工程では、チップ19内の構造体に捕捉された核酸の溶離を行う。

【0036】

アーム11とノズルホルダー7の制御によりノズル9に分注チップ15を所定の動作により取り付けした後、アーム11とノズルホルダー7、及びシリンジ3の制御により溶離液ボトル23から所定量の溶離液を吸引し、制御によりノズルホルダー7を反応容器ラック16上の所定の反応容器17に吐出する。吐出後、アーム11とノズルホルダー7の制御によりノズルホルダー7をチップ抜き27の位置へ移動し、所定の動作によりノズル9から分注チップ15を取り外す。

【0037】

ノズルホルダー7の移動後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により溶離液の入った反応容器ラック16上の所定の反応容器17に移動し、シリンジ2の制御によりチップ19内へ溶離液を吸引する。吸引後、シリンジ2の制御により、所定の回数吸引と吐出を繰り返し、構造体と溶離液を接触させる。所定の回数、吸引と吐出を繰り返した後、チップ19内に反応容器17内の溶離液を吸引した後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により精製品ラック20に収納された所定の精製品収納容器21へ移動し、チップ19内の溶液をシリンジ2の制御により吐出する。吐出後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により液受け29へ移動する。

【0038】

必要に応じて第5工程も所定の回数繰り返す。

【0039】

第5工程終了後、アーム10、ノズルホルダー6の制御により、ノズルホルダー6をチップ抜き27の位置へ移動し、所定の動作によりノズル8からチップ19を取り外す。

【0040】

次に、本発明の核酸捕捉用構造体について説明する。

【0041】

(実施例1-1 核酸捕捉用構造体の形成方法1)

図3に形成の工程を示す。以下に各工程についての説明を行う。

【0042】

①シリカ粒子*1と有機物である樹脂粒子32a*2をシリカ粒子に対して樹脂粒子体積濃度10~60Vol%になるように比重換算して秤量する。その後所定量の珪酸エチル溶液*3を加え、粘土状になるまで攪拌しPTFE製の型34に入れる。図において33はシリカ粒子と珪酸エチル溶液の混合物を示している。

【0043】

②PTFE製の型34のまま100~200℃にて30分熱処理し型34内の珪酸エチルを縮重合させる。これにより型から取り出しても崩れない成型品となる。

【0044】

③型34から取り出した成型品を、少なくとも400℃以上にて3時間熱処理し、樹脂粒子32aを完全に燃焼させる。これにより樹脂粒子32a部分が空孔となり流路が形成された構造体31aが形成される。図においては省略しているが、樹脂粒子32aが存在していた空孔の部分には細かいシリカ粒子の凹凸ができており、液体試料との接触面積を大きくし核酸を捕捉し易いようにしている。

【0045】

- * 1 APPROX: SIGMA製, 粒径8~10 μ m
- * 2 MBXシリーズ: 積水化成工業(株)製, 粒径50~100 μ m,
CLシリーズ: 住友精化(株)製, 粒径180~1000 μ m
- * 3 珪酸エチル溶液 (珪素化合物含有ゾルゲル溶液: シリコンアルコキシドのアルコール溶液)

珪酸エチル25g、水17.28g、塩酸(12N)0.3g、エタノール5.42gにて調整

なおこの方法においてシリカ粒子および樹脂粒子32aは上記製品に限定されるものではない。また珪酸エチル濃度も変更可能である。使用する珪素酸化物類の粒子は0.001 μ m以上20 μ m以下とすることが望ましい。0.001 μ m以下の場合、調合時に飛散し濃度が安定しないし、取り扱い上も粉塵問題等が発生する。また、20 μ m以上の場合、流路を形成するための有機物との隙間が大きくなり、構造体がもろく崩れやすくなる。

【0046】

使用する有機物が本実施例のように樹脂粒子32aの場合は50 μ m以上1000 μ m以下とすることが望ましい。50 μ m以下の場合、通水性が悪く液の吸引吐出時に圧がかかり核酸が切断される可能性がある。また1000 μ m以上の場合空孔が大きくなり、構造体が形成できず崩れてしまう。

【0047】

ここで珪酸エチル溶液 (珪素化合物を含有するゾルゲル溶液) は珪素酸化物類の粒子を結合させるバインダーの働きをするものである。本実施例では珪酸エチル溶液を使用した。バインダーとしては種々の金属のゾルゲル液を用いてもよい

が、珪素化合物を含有するゾルゲル液を用いることで、このバインダーの部分も核酸を結合することができるため、核酸捕捉の効率が向上する。

【0048】

ゾルゲル液の組成としては、シリコンアルコキシドを主成分とし、これに水（加水分解用）、酸またはアルカリ（触媒用）に、溶媒（均質溶液調整用、アルコキシドを用いる場合は一般にアルコールを用いる）を混合した溶液を用いる。なおゾルゲル液は上記の組成だけではなく、アルコキシドの変わりにカルボン酸塩や無機化合物を用いることも可能であるし、溶媒としてエチレングリコール、エチレンオキシド、トリエタノールアミン、キシレン等を用いることも可能である。また必要に応じて、例えば亀裂が生じにくいように添加剤を追加することも可能である。

【0049】

本発明者等の知見によれば、シリカ粒子に対する樹脂粒子32aの体積濃度は検体液13の通水に影響するため、熱処理後核酸捕捉用構造体が崩れない程度に、できるだけ高濃度にすることが望ましい。なお樹脂粒子体積濃度は用いる樹脂粒子32aの粒径によって異なり、構造体31が崩れないように樹脂粒子32aの粒径が大きくなるにつれその体積濃度は小さくすることが望ましい。また、粒子によって比重も異なるため、それによっても樹脂粒子濃度は異なる。

【0050】

また②の熱処理については成型を目的としているため珪酸エチル溶液が固化する温度以上でかつ型に使用しているPTFEの融点以下ならばいずれの温度でも良い。時間は溶媒（本実施例においてはエタノール、水）がなくなるまでを目安とする。また③熱処理については樹脂粒子32aが燃焼して消滅するまでを目安とする。なお使用した樹脂粒子32aにより熱処理温度は変更されることもあるし、時間も樹脂粒子32aの種類・量により変更可能である。

【0051】

（実施例1-2 核酸捕捉用構造体の形成方法2）

実施例1-1と同様に図3に形成の工程を示す。以下に各工程についての説明を行う。

【0052】

①シリカ粒子と有機物である繊維32bをシリカ粒子に対して有機物体積濃度10～60Vol%になるように比重換算して秤量する。PTFE製の型34に繊維32bを入れ、その後所定量のゾルゲル液を加える。図において33はシリカ粒子とゾルゲル液の混合物を示している。

【0053】

②PTFE製の型34のまま100～200℃にて30分熱処理し型34内の珪酸エチルを縮重合させる。

【0054】

③型34から取り出した成型品を、少なくとも400℃以上にて3時間熱処理し、繊維32bを完全に燃焼させる。これにより繊維32b部分が空孔となりシリカ粒子が付着した流路が形成された構造体31bが形成される。

【0055】

本実施例のように有機物として繊維32bを用いる場合は、先の実施例の様に樹脂粒子32aの場合よりもバインダーとして使用している珪酸エチル溶液の量を増やすことが望ましい。繊維32bは樹脂粒子32aとは異なり連続しているため構造体31とするためには、バインダーの量を増やしより強固な構造体31にする必要がある。具体的には②の工程の後、成型体に珪酸エチル溶液を適量浸透させた後、熱処理し珪酸エチルを縮重合させる。必要ならばこの工程を数回繰り返す。なお、繊維32bとしては、合成繊維、天然繊維のいずれを用いても良く、天然繊維としては木や竹など植物を用いることができる。

【0056】

(実施例2 核酸分離用構造体の形成方法3)

図4に形成の工程を示す。以下に各工程についての説明を行う。

【0057】

①中空樹脂粒子36*4とエタノールをエタノールに対して中空樹脂粒子重量濃度約10wt%になるように秤量し、薬さじにて攪拌する。SiO₂超微粒子エタノール分散液*5を適量加え、さらに薬さじにてよく攪拌しPTFE製の型34に入れる。

【0058】

②PTFE製の型34のまま170℃、20分熱処理し、型24から取り出す。これにより中空樹脂粒子36により流路が形成され、その流路面に珪素酸化物であるSiO₂超微粒子37が存在しており、ここに核酸が捕捉される。

【0059】

* 4 F-80ED：松本油脂製薬(株)製，平均粒径80～90 μm

* 5 OSCAL：触媒化成工業(株)製，粒径80～300 nm

なおこの方法においても中空樹脂粒子36およびSiO₂超微粒子34は上に記載の製品に限定されるものではない。

【0060】

また本発明者等の知見によれば、本形成法に関してバインダーとして珪酸エチル溶液（珪素化合物を含有するゾルゲル溶液）を用いることもできるが、本実施例に示すように中空樹脂粒子34の耐熱温度をわずかに超える温度で熱処理することによって、その中空樹脂粒子34同士が溶融付着し、スポンジ状の成型体を得られることがわかった。ただし、熱処理温度が低すぎると中空樹脂粒子34同士の溶融付着がないため成型体とならず粉状となる。一方熱処理温度が高すぎると、中空樹脂粒子34が破裂してしぼんで小さくなり、弾力のあるスポンジ状には成型しない。さらに熱処理時間が長すぎると、温度が高すぎる状態と同様にしぼんでしまう。また中空でない樹脂粒子の場合は熱処理温度が高すぎて粒子の溶融が進むと、流路が確保できなくなる。そのため本形成方法においては材料に適した、熱処理の温度と時間の選定が必要である。

【0061】

本実施例1、2の形成方法において型34に金属を用いることも可能であるが、金属表面とゾルゲル溶液の成分が結合する可能性があり、結合がおこると構造体31を型から取り出す際に崩れたり割れたりする。金属製の型を使用する際は結合がおこりにくいように表面にゾルゲル溶液と反応しない物質を処理しておくことが望ましい。

【0062】

（実施例3 核酸捕捉用構造体の形成方法3）

①金属製の多孔質体を珪酸エチル溶液の中に浸漬させる。

【0063】

②溶液から取り出した多孔質体を100～200℃にて30分熱処理し、珪酸エチルを縮重合させ、多孔質体の多孔質体部分にシリコンアルコキシドの皮膜を形成する。

【0064】

③必要な場合はこの過程を複数回繰り返す。

【0065】

本実施例の構造体は、多孔質体の多孔質部分を流路として用いることにより流路表面積を増加させ、シリコンアルコキシドで核酸を捕捉するようにしている。つまり、シリコンアルコキシドをバインダーではなく核酸捕捉材として使用している。

【0066】

なお、金属製の多孔質体の代わりに実施例1-1の構造体を用いるか珪酸エチルに珪素酸化物粒子（例えばシリカ粒子）を混合させ用いても良い。その場合、実施例1-1とは異なり、シリカ粒子は流路に凹凸を付け流路表面積を増やすために用いるので、シリカ粒子でなくとも流路に凹凸を付けられるような材料であれば何を用いても良い。

【0067】

或いは、金属の多孔質体を一度目は何らかの粒子を含むバインダーとして使用できるゾルゲル液に浸漬させ、熱処理をすることで多孔質部分に粒子による凹凸をつけ、その後珪酸エチルに浸漬させ熱処理をし、凹凸面に被膜を作成しても良い。

【0068】

（実施例4 チップおよびその製造方法）

上記何れかの実施例にて形成した構造体31をチップ匡体（便宜上構造体を封入（内包）していないチップをこの様に呼ぶ）19a内に封入して本発明のチップ19を製造した。図5に本発明のチップ19を示す。製造方法としては、チップ匡体19aに構造体31を圧入する方法がある。またチップ匡体19aを構造体31に固定するため接着剤を使用する場合は非浸透性の接着剤38を用いる。

浸透性の接着剤の場合、構造体 31 内部への浸透により流路の確保が困難となるためである。あるいは、チップ匡体 19a 内に構造体 31 を挿入した後、チップ匡体 19a を変形して封入する方法もある。その外に、通水の妨げにならないようなメッシュ、フィルター等を保持材 39 として用いて構造体 31 をチップ匡体内に封入する方法もある。

【0069】

いずれの場合も核酸を含有する検体液 13 が効率よく構造体 31 の内部を通過できるように、構造体 31 がチップ断面一面に存在するような構成とすることが望ましい。なお、核酸の捕捉量を高めるためチップ 19 内に複数の構造体 31 を入れることも可能である。

【0070】

なお本発明のチップはこの様に簡単な構成であるため、使用后廃棄する際のチップ匡体と構造体との分別が容易である。

【0071】

(実施例 5 チップを用いた核酸捕捉の確認実験)

形成した核酸構造体 31 を実施例 4 に示したようにチップ匡体 19a 内に圧入して製造した本発明のチップ 19 を用いて核酸捕捉の確認実験を行った。実験方法は先に説明した前処理装置 1 の操作手順にしたがって核酸の抽出を行った。その後、精製品収納容器 21 内に得られた検体液 13 をサンプルとして確認のために PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を行い、電気泳動、蛍光染色を行い評価を行った。

【0072】

各種構造体 31 の形成条件および核酸の回収結果を表 1 に示す。

【0073】

【表1】

表1

	材料	構成		核酸回収率
		樹脂粒子粒径(μm)	体積濃度(Vol%)	
実施例1	樹脂粒子 シリカ粒子 珪酸エチル溶液	355~425	20	62
		//	30	58
		250~355	30	63
		//	40	59
		150~250	40	65
		//	50	58
実施例2	中空樹脂粒子 シリカ粒子・溶媒	シリカ粒子粒径(μm)		—
		0.12		52

【0074】

以上のように本発明のチップ19を用いることで、簡単に高回収率でDNAを分離できることを確認した。

【0075】

【発明の効果】

本願発明の構造体は、真空引きや加圧をする必要がなく液体試料が簡単に通過可能であり、液体試料の流路となる部分には核酸を吸着する珪素酸化物が凹凸をなしているので、液体試料の中から切断等の欠陥なく高回収率にて分離することが可能となり、回収率が高いので必要な液体試料も微量ですむこととなる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

遺伝子診断前処理装置平面図である。

【図2】

核酸分離部流路を示す模式図である。

【図3】

構造体を形成する工程を示す図である。

【図 4】

構造体を形成する他の工程を示す図である

【図 5】

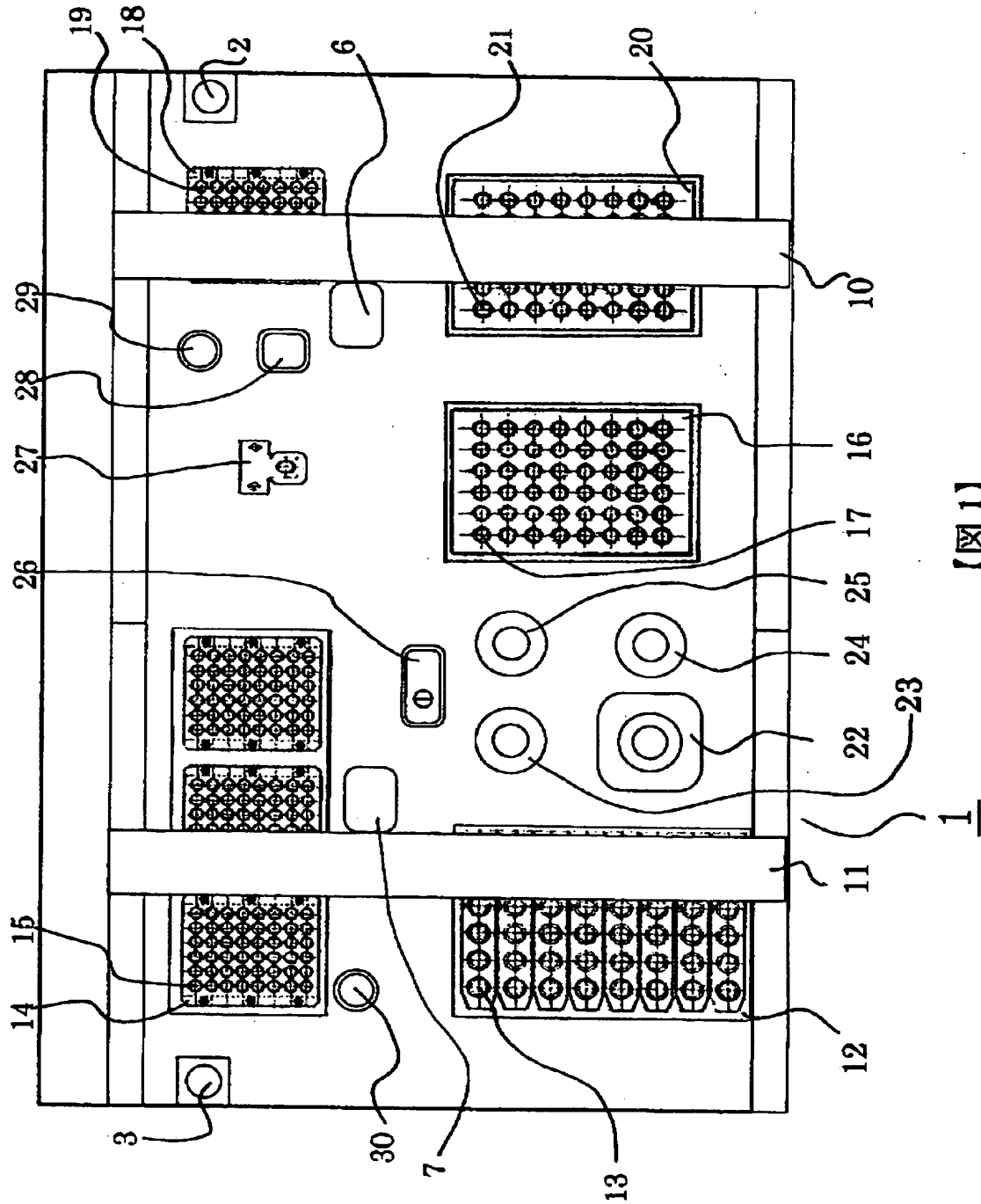
本願発明の構造体を内包したチップを示す図である。

【符号の説明】

1…遺伝子検査前処理装置、2，3…シリンジ、4，5…配管、6，7…ノズルホルダー、8，9…ノズル、10，11…アーム、12…検体ラック、13…検体液、14…分注チップラック、15…分注チップ、16…反応容器ラック、17…反応容器、18…チップラック、19…チップ、20…精製品ラック、21…精製品収納容器、22…洗浄液ボトル、23…溶離液ボトル、24…希釈液ボトル、25…結合促進剤ボトル、26…洗浄部、27…チップ抜き、28…廃液口、29，30…液受け、31…構造体、32a…樹脂粒子、32b…繊維、33…珪素酸化物類とシリコンアルコキシド溶液の混合物、34…型、35…有機溶剤、36…樹脂粒子、37… SiO_2 微粒子、38…非浸透性接着剤、39…保持材。

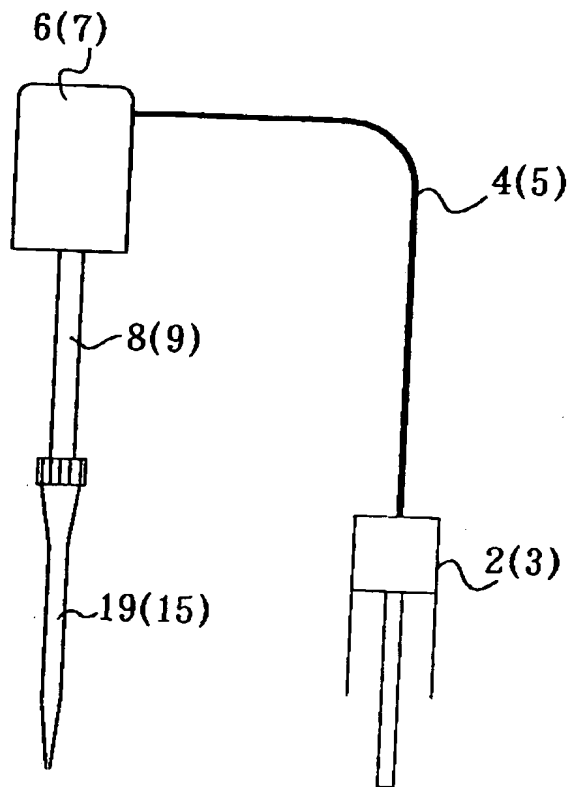
【書類名】 図面

【図 1】



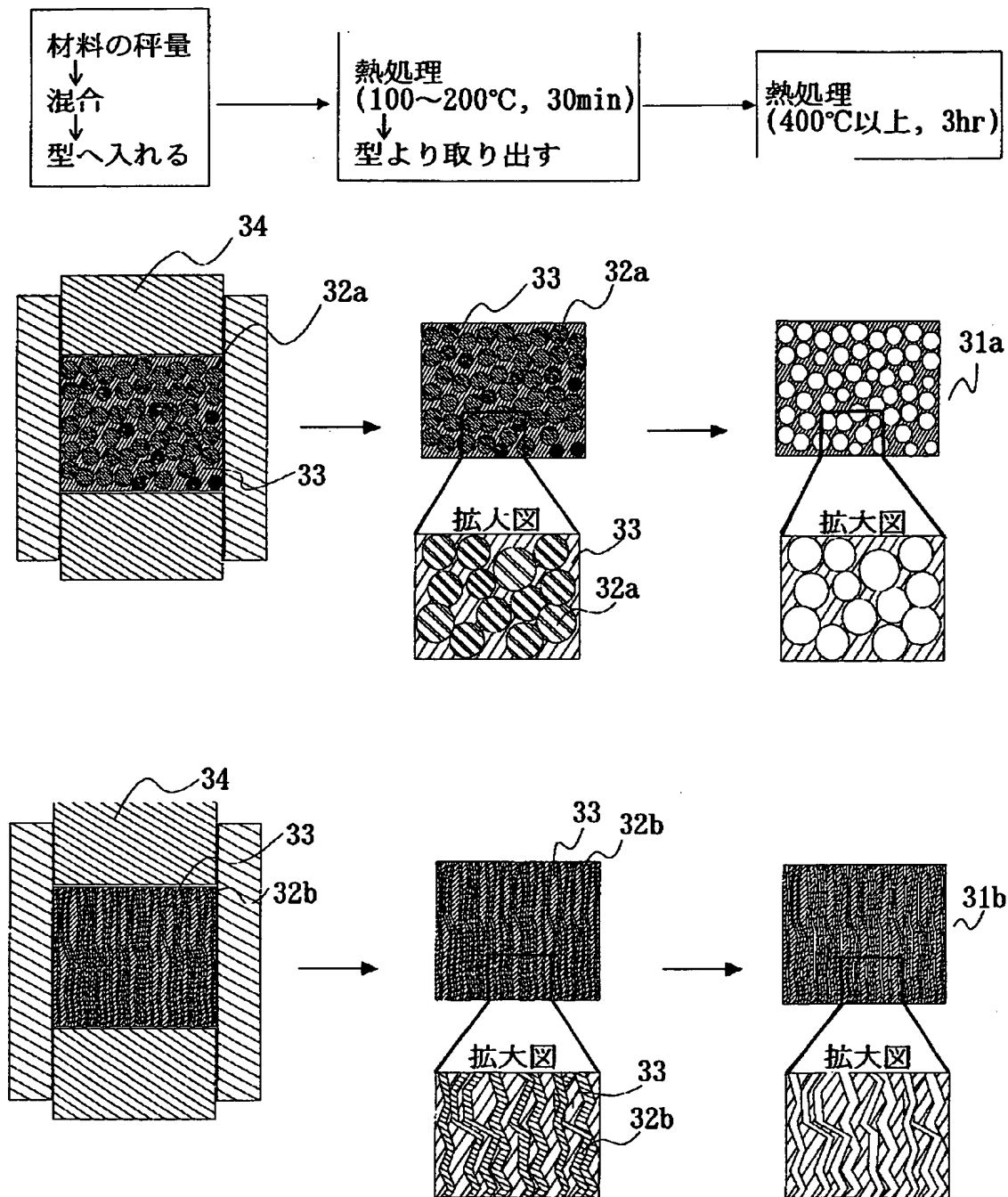
【図 1】

【図2】



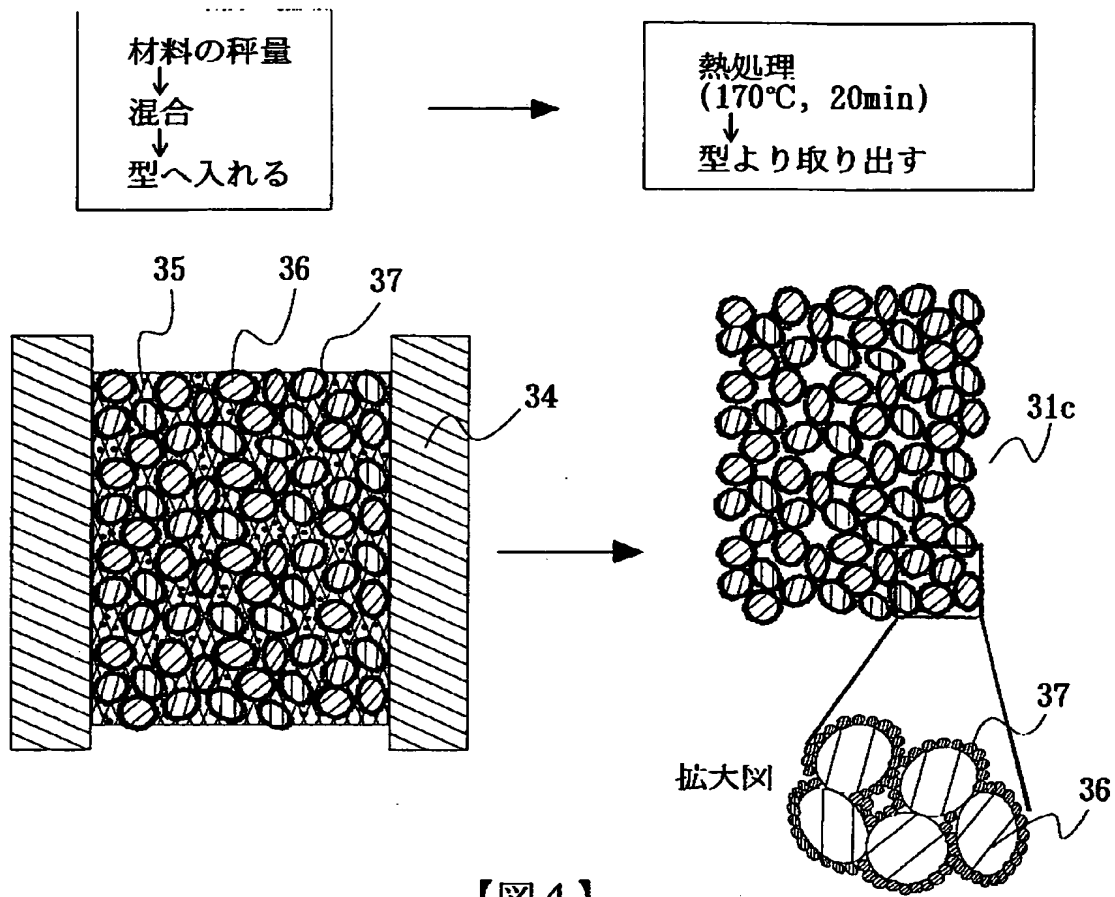
【図2】

【図 3】



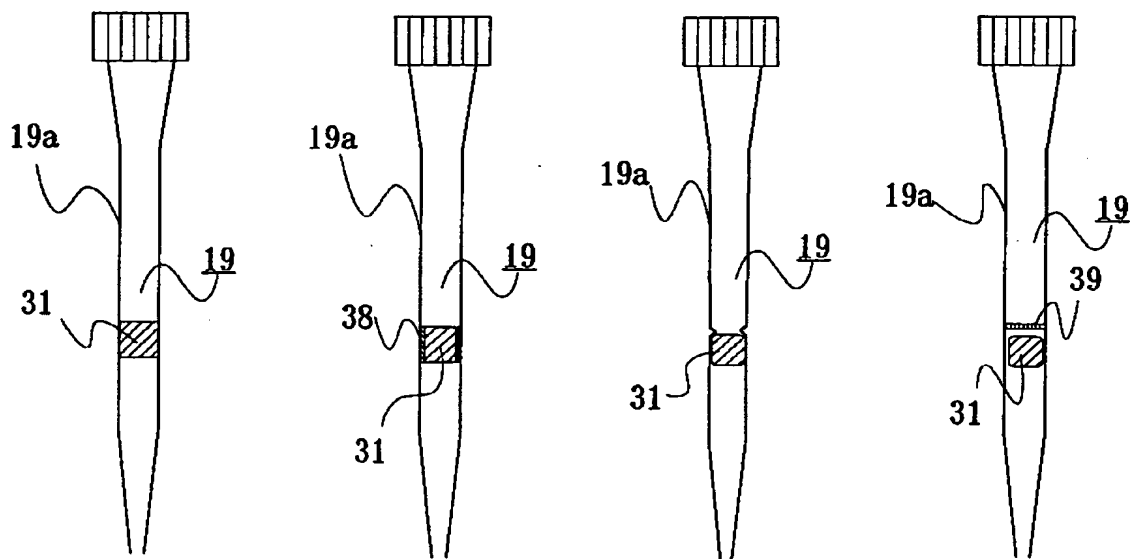
【図 3】

【図 4】



【図 4】

【図 5】



【図 5】

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

核酸を試料の中から短時間且つ切断等の欠陥なく高回収率にて分離することが可能な材料と、その材料を安価に製造する方法を提供する。

【解決手段】

有機物 32a と、珪素酸化物類の粒子と珪素化合物を含有するゾルゲル溶液 33 とを混合し型 34 に入れ、熱処理によりゾルゲル溶液 33 を縮重合させて成形し、更に熱処理し有機物 32a を燃焼させることにより、珪素酸化物類よりも径が大きく液体試料が通過可能となる孔を有する構造体を作成する。

【選択図】 図 3

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

【氏名又は名称】 株式会社日立製作所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100068504

【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内1-5-1 株式会社日立製
作所 知的所有権本部内

【氏名又は名称】 小川 勝男

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日	1990年 8月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名	株式会社日立製作所